

全身で蛍光タンパク質を発現する トランスジェニックラット作出に関する研究

*Generation of transgenic rats carrying the fluorescent protein gene
under the control of a CMV promoter*

柏崎直巳, 紫野正雄, 猪股智夫

麻布大学大学院獣医学研究科

Naomi Kashiwazaki, Masao Shino, Tomoo Inomata.

Graduate school of Veterinary Medicine, Azabu University

Abstract: The objective of the present study was to generate transgenic rats carrying and expressing the fluorescent protein gene all over their body. Rat pronucleus stage embryos were microinjected with the transgenes (EGFP, d2EGFP, DsRed), then transferred into recipient female rats. Females aged at 4-6 weeks as embryo donors, at 12-18 weeks as embryo recipients, and males aged at 12-36 weeks for mating, were used in the present study. All the used rats were Wistar strain. Embryo donors were superovulated by injection of eCG and hCG, and naturally mated with matured males. Pronucleus stage embryos were collected from the donors at 29 hrs after the hCG injection. The gene constructs as transgenes were made as follows. The fluorescent protein gene (EGFP, d2EGFP, DsRed), which were included the promoter of the CMV-IE and the terminator of the SV40, were purchased commercially. The DNA (5 μ g/ml) solution was prepared for microinjection. Pronucleus stage embryos were microinjected with the DNA solution. Morphological normal embryos selected among the embryos cultured for 16 hrs after microinjection were then transferred into recipient females that were mated with vasectomized male rats to induce pseudo-pregnancy. The extracted DNA from the tails of weaned pups was tested for the presence of the transgene by the PCR method. The 241, 281 and 652 embryos injected with the EGFP, d2EGFP and DsRed, were transferred to the 5, 2 and 11 recipients, 2, 2 and 7 females of the recipients gave birth to 9, 7 and 20 new born pups. The 2, 0 and 2 pups of them were confirmed as transgenic founders. These results indicate that it can be generated that transgenic rats were expected expressing the fluorescent protein gene all over their body.

目 的

哺乳動物における遺伝子組換え（導入，改変，トランスジェニック）動物の作製は，これまで主にマウスを宿主動物として行われてきた。一方，ラットは医薬品開発などの分野で催奇形性，生殖毒性，などの試験や実験医学，生理学などの基礎生物学の

分野で広範に利用されている小実験動物で，マウス同様に非常に重要な動物である。ラットにおいても1990年にGantenら（1）がトランスジェニックラットを作製してから，多く分野の研究面でめざましく進展している。これまでもMiniラット（2）や肝臓ガンモデルラット（3），動物工場のモデルとしてのトランスジェニックラットなどの作製（4，5）が

報告されており、今後、ラットの生理学や薬理学などの研究でトランスジェニックは今後さらに重要な手法として期待されている。

我々は、様々な生物学分野で応用可能な全身でGFPなどの蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックラットの作製を目的に、全身でGFPなどの蛍光タンパク質を発現する遺伝子コンストラクトの構築を試み、そのトランスジェニックラットの作製を試みた。このようなトランスジェニックラットが作製できれば、そのラットは様々な分野、例えば再生医学など、で多大なる貢献が期待される。

方法

「蛍光タンパク質遺伝子を含むプラスミドの構築」

基本的な遺伝子組換え操作は、和光純薬社製の特級グレードまたは宝酒造社製の試薬および酵素類を使用し、標準的な方法に従って行った(6)。蛍光タンパク質として、野生型GFPよりも発光が強く、半減期が24時間以上安定であるEGFP、半減期が2時間で不安定型GFPであるd2EGFP、さらにGFPとホモロジーの低いDsRedの3種類の蛍光タンパク質を株式会社クローンテックから購入して使用した。それぞれの蛍光タンパク質遺伝子は、その上流にCMV-IEプロモーター、下流にSV40ターミネーターを含んでいる。これらのプラスミドを構築し、導入遺伝子として増殖させた。構築したコンストラクトはEndo Free Plasmid Kits (QUIAGEN)を用い抽出した。その後、EcoO109IIを消化し、切断した。このDNA断片の制限酵素を完全に失活除去するため、QIAquick PCR Purification Kit (QUIAGEN)で精製した。これをマイクロインジェクションに用いるために10mM Tris-HCl/0.1 mM EDTA buffer (pH 7.4)で5mg/mlの濃度に希釈し、 -20°C で保存した。

「供試動物」

使用したラットはすべてWistar系のラットを使用した。前核期胚の摂取には4-6週齢の幼若雌ラットを用い、交配用には成熟雄ラットを使用した。これらのラットは麻布大学附属生物科学総合研究所で飼育した。

「ラット前核期胚の採取」

前核期胚はすべて過剰排卵処理したラットより採取した。過剰排卵処理のホルモンとしてequine

chorinic gonadotropin (eCG:セロトロピン:帝国臓器)およびhuman choric gonadotropin (hCG:ゴナトロピン:帝国臓器)を使用した。雌ラットにeCG 150 iu/kgを腹腔内注射し、その48時間後に、hCG 150 iu/kgを腹腔内投与し、直ちに同系の雄ラットと一晚同居させた。前核期胚はhCG投与29時間後に卵管を採取し、0.4 mg/mlのBSA、0.1%ヒアルロニターゼを含むmodified Krevs-Ringer bicarbonate solution (m-KRB) (7)で灌流して胚を採取した。採取胚は4 mg/mlのBSAを含むm-KRB (C-KRB)中で3回以上洗浄し、前核期胚を選別し50 mlのC-KRBの小滴中に入れ、マイクロインジェクションまで 37°C 、5% CO_2 、湿度飽和のインキュベーター内で静置した。

「ラット前核期胚への遺伝子注入」

ノマルスキー微分干渉装置付の倒立顕微鏡(OLYMPUS:IX-71)にマイクロマニピュレーター(Narishige: MNO-202N, MO-202U, MN-4)を取り付け、胚へのDNAインジェクションを行った。インジェクションピペットは芯入りガラス管(Narishige: GDC-1)を用い、FLAMING/BROWN micropipette puller (SUTTER INSTRUMENTS:P-97/IVF)で一定のプログラムにて作製した。インジェクションピペットを前核期胚雄性前核に挿入し、前核の直径が約2倍になるまでDNA溶液を注入した。DNA注入直後、形態学的に生存している胚をm-KRBにて培養した。

「遺伝子導入胚のレシピエントへの移植および分娩」

マイクロインジェクション16時間後、培養したDNA注入胚を形態的に異常胚と正常胚に選別をし、正常胚を胚移植に用いた。精管結紮した同系雄と交配させ偽妊娠誘起した雌ラットをレシピエントとした。この雌をネンブタール(大日本製薬)で麻酔後、外科的に卵巣を引き出し、卵巣嚢を出血させないようにペンホルダー型焼灼器(SIGMA)で切開した。移植胚をパスツールピペットに吸い、卵管采にそのピペットを挿入して移植した。DNA注入胚は1匹のレシピエントにあたり、左右の卵管へ各々20個を最大数として移植した。そして移植後22-23日目に自然分娩をさせた。分娩後21日を過ぎた時点で離乳を行い、同時にDNA解析用のサンプルをえるために約1.5 cm断尾をした。このサンプルからDNeasy Tissue Kit (QUIAGEN)を使用してDNAを抽出した。

「ゲノム DNA の解析」

抽出した DNA は融解後、PCR 法により解析した。0.2 ml PCR チューブに H₂O 12 ml, 10 × EX Taq buffer 2 ml, 2.5 mM each dNTP 2 ml, 50 μM CMV D1 Primer 1 ml, 50 μM Flori D1 Primer 1 ml, Template 1 ml を加えた。これをサーマルサイクラーにセットし、95 °C で 3 分間の加熱中に EX Taq polymerase 1 ml (2.5U/ml) を加え、Total 20 ml で PCR を開始した。その後 95 °C で 30 秒間の熱変性反応、53 °C で 10 秒間アニーリング反応、72 °C で 1 分間の伸長反応 (last extension は 7 分) を 30 サイクル行った。これを 4 °C で保存し、0.7 % アガロースゲルで電気泳動した。ウェルに PCR 産物 5 ml, 30 % GD mix 1 ml を混合したものでアプライし、定電圧 (100V) にて 30 分間電気泳動した。プライマーは DsRed, EGFP, d2EGFP とともに同じものを使用し、それぞれ 2299 bp, 1993 bp, の PCR 産物が検出されるように、CMV-IE 上流, F1 ori 下流に 5'-CGG-GGT-CAT-TAG-TTC-ATA-GCC-CAT-ATA-TGG-AGT-TCC-GCG-3' と 5' GGT-GGT-TAC-GCG-CAG-CGT-GAC-CGC-3' を設定した。

結果と考察

625 個の前核期胚に DsRed をマイクロインジェクションした。これらを 11 匹のレシピエントに移植した結果、7 匹が妊娠し、20 匹の産子がえられた。その結果、2 匹の雄から DsRed の導入が確認された。また EGFP を 241 個の前核期胚にマイクロインジェクションし、5 匹のレシピエントに移植したところ、2 匹が妊娠し 9 匹の産子をえた。えられた 9 匹の産子のうち 1 匹は生後 2 日目に死亡した。生存した 8 匹の産子のうち 2 匹の雄から EGFP の導入が確認された。さらに 281 個の前核期胚に d2EGFP をマイクロインジェクションし、これらを 2 匹のレシピエントへ移植した結果、2 匹が妊娠し 7 匹の産子がえられた。これらの産子への d2EGFP の導入は認められなかった。これらの EGFP 導入ラットおよび DsRed 導入ラットは、それぞれ尾部組織を蛍光顕微鏡にて観察し、導入遺伝子の発現を調べた。この EGFP ラット 2 匹のうち 1 匹は、非常に強い緑色の蛍光を示したが、もう 1 匹は弱い蛍光であった。また、DsRed ラットはどちらの個体も非常に弱いオレンジ色の蛍光を示した。

トランスジェニック個体作製には非常に多くの要因が個体作製効率や個体の表現型に影響することが報告されている。前核に注入されたトランスジーンのは多くは 1 細胞期胚時にゲノム DNA に組み込まれる (8)。また、20-30 % が 2 細胞期以降に取り込まれ、これらは作製された個体がモザイクとなり、生殖系列にトランスジーンが組み込まれていないことも多い (9)。本研究においても作製された個体の発現強度が異なるのはこれらの影響があると考えられる。ラットは特にマイクロインジェクションが難しいとされている。ラットの核膜は硬くべとべととしており (10)、インジェクションピペットを前核内に挿入するために技術を必要とし、インジェクション後に注入胚が死亡してしまう率が高い。また、前核への DNA 溶液の注入時に前核膜の通過と注入を促すために軽くステージをたたき、衝撃を与えるが、この操作もマウスやブタの場合と比較し、強い刺激を与えなくては前核膜を通過しない。また、細胞膜についてもマウス胚よりも通過に抵抗感があるため (11)、この際のショックも胚の発育に影響するものと考えられる。作製された EGFP ラットおよび DsRed ラットはそれ自体がマーカーとして多くの分野で応用できると考えられる。EGFP ラットのうちの 1 匹は非常に強い蛍光を示しているが、現在のところ、健康上の問題はまったく見られていない。DsRed においても、作製された個体に健康上の問題はないため、少なくとも強い毒性はないと考えている。しかし、今後さらに様々な臓器での蛍光タンパク質の発現や強度、導入遺伝子の生殖系列への伝達についての検討が必要である。

要 約

全身で蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックラットの作製を目的とし、蛍光タンパク質遺伝子 (EGFP, d2EGFP, DsRed) を前核期胚の前核へ注入 (MI) し、注入胚をレシピエントへ移植した。前核期胚のドナーとしては 4-6 週齢、交配用には 12-36 週齢、レシピエントとしては 12-18 週齢の Wistar 系ラットを用いた。eCG および hCG 投与による過剰排卵処置した雌と成熟した雄を自然交配させ、hCG 投与 29 時間後に卵管灌流により前核期胚を採取した。MI に用いた遺伝子コンストラクトは以下のよう

に作製した。蛍光タンパク質遺伝子としては、EGFP, d2EGFP, DsRedを購入した。それぞれの蛍光タンパク質遺伝子上流にCMV-IEプロモーター, 下流にSV40ターミネーターを含んでいる。この様なプラスミドを構築し, 導入遺伝子として増殖させた。これらをプロモーター上流の1箇所の制限酵素サイトで切断し, 5 mg/mlに調整してMIに用いた。前核期胚の雄性前核に蛍光タンパク質遺伝子(EGFP, d2EGFP, DsRed)をMIし, その16時間後に形態的に正常な1-2細胞期胚を偽妊娠誘起したレシピエントの卵管に移植した。えられた産子は離乳後, 尾部組織よりゲノムDNAを抽出しPCR法により注入遺伝子の存在を調べた。DsRedを652個の胚にMIして11匹のレシピエントに卵管移植した結果, 7匹が妊娠し, 20匹の産子をえた。この産子のうち2匹がDsRed導入ラットであった。EGFPを241個の胚にMI後, 5匹のレシピエントに移植した結果, 2匹が妊娠し, 9匹の産子がえられた。このうち2匹がEGFP導入ラットであった。また, d2EGFPを281個の胚にMIし, 2匹のレシピエントに移植した結果, 2匹が妊娠して7匹の産子がえられたが, d2EGFPが導入された産子はえられなかった。本研究により, 全身で蛍光タンパク質遺伝子(EGFP, DsRed)の発現が期待されるトランスジェニックラットを作製することができた。これらのトランスジェニックラットは, 様々な研究分野でのマーカーとして有望で, 広範な分野での応用が期待される。

文 献

- 1) Mullins JJ, Ganten D., Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature* 344, 541-555 (1990).
- 2) Matsumoto K, Kakidani H, Takahashi A, Nakagata N, Anzai M, Matsuzaki Y, Takahashi Y, Miyata K, Utsumi K, Iritani A., Growth retardation in rats whose growth hormone gene expression was suppressed by antisense RNA transgene. *Mol Reprod Dev* 36, 53-58 (1993).
- 3) Hully JR, Su Y, Lohse JK, Griep AE, Sattler CA, Haas MJ, Dragan Y, Peterson J, Neveu M, Pitot HC. Transgenic hepatocarcinogenesis in the rat. *Am J Pathol* 145, 386-97 (1994).
- 4) Hochi S, Ninomiya T, Waga-Homma M, Sagara J, Yuki A. Secretion of bovine alpha-lactalbumin into the milk of transgenic rats. *Mol Reprod Dev* 33, 160-4 (1992).
- 5) Ninomiya T, Hirabayashi M, Sagara J, Yuki A. Functions of milk protein gene 5' flanking regions on human growth hormone gene. *Mol Reprod Dev* 37, 276-83 (1994).
- 6) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning, A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA. 1989.
- 7) Toyoda Y. and Chang MC. Fertilization of rat eggs *in vitro* by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. 1074. *J Reprod Fertility* 36, 9-22 (1974).
- 8) Martinez-Salas E, Linney E, Hassell J, DePamphilis ML., The need for enhancers in gene expression first appears during mouse development with formation of the zygotic nucleus. *Genes Dev.* 3(10), 1493-506 (1989).
- 9) 山村 研一, マイクロインジェクション法によるトランスジェニックマウスの作製. *実験医学* 5; 1123-1127 (1987).
- 10) Charreau B, Tesson L, Soulillou JP, Pourcel C, Anegon I., Transgenesis in rats: technical aspects and models. *Transgenic Res.* 5(4), 223-34 (1996).
- 11) Heideman J., Transgenic rats: a discussion. *Biotechnology* 16: 325-32 (1991).
- 1) Mullins JJ, Ganten D., Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene.